Aus dem Hygienischen Institut der Universität Basel
(Vorsteher: Prof. Dr. R. Doerr)

Die Auslösung des anaphylaktischen Schocks durch intrazerebrale Antigeninjektionen.

Ein Beitrag zur Kenntnis der Resorptionsverhältnisse im Zentralnervensystem

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Universität Basel

vorgelegt von

Alois Schwarzmann
aus Vendlincourt (Bern)

Jena
Gustav Fischer
1931

Aus dem Hygienischen Institut der Universität Basel
(Vorsteher: Prof. Dr. R. Doerr)

Die Auslösung des anaphylaktischen Schocks durch intrazerebrale Antigeninjektionen.

Ein Beitrag zur Kenntnis der Resorptionsverhältnisse im Zentralnervensystem

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Universität Basel

vorgelegt von

Alois Schwarzmann
aus Vendlincourt (Bern)

Jena
Gustav Fischer
1931

Von der Medizinischen Fakultät Basel
genehmigt auf Antrag von Herrn Professor Dr. R. Doerr.

Tag der Promotion: 20. November 1930.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Abdruck aus der
Zeitschrift für Immunitätsforschung und experimentelle Therapie.
Bd. 69. 1930/1931.
Verlag von **Gustav Fischer** in **Jena**.

Beim Meerschweinchen kann die anaphylaktische Allgemeinreaktion in zwei Formen auftreten, als akuter oder protrahierter Schock. Nur über den Mechanismus des erstgenannten, innerhalb weniger Minuten zum Tode führenden Reaktionstypus sind wir zuverlässig unterrichtet; wir wissen, daß er auf einer bronchostenotischen Erstickung beruht und daß die Verengerung der Bronchien durch eine spastische Kontraktion der glatten Bronchialmuskulatur bewirkt wird. Aus der Existenz der passiven Anaphylaxie ergibt sich ferner eindeutig, daß der Reiz, welcher die glatten Muskelfasern zur Zusammenziehung veranlaßt, letzten Endes auf eine Reaktion zwischen Antikörper und Antigen zurückgeführt werden muß; der Antikörper ist im Organismus des aktiv oder passiv sensibilisierten Meerschweinchens bereits vorhanden, das Antigen wird durch den Akt der „Erfolgsinjektion" von außen her zugeführt.

Die Möglichkeit einen akut letalen Schock auszulösen hängt nun bekanntlich in hohem Grade von der Art der Einverleibung des Antigens ab. Intravenöse oder intrakardiale Injektionen geben nicht nur unter geeigneten Versuchsbedingungen regelmäßig positive Resultate, sondern erfordern auch sehr kleine Antigendosen, intraperitoneale oder subkutane erzeugen, selbst wenn man die Antigenquanten ganz beträchtlich erhöht, so gut wie immer nur einen protrahierten Schock, und die seltenen Aus-

nahmen von dieser Regel lassen sich durch den Nachweis spezieller Faktoren erklären (J. H. Lewis, Doerr und Seidenberg). Diese auffällige Differenz wird so interpretiert, daß die dem akuten Schock zugrunde liegende Bronchokonstriktion dann und nur dann zustande kommt, wenn im Blute eine bestimmte Antigenkonzentration rasch hergestellt wird, eine Auffasssung, die auch durch andere Argumente gestützt werden kann.

Der isolierte (überlebende) Uterusmuskel sensibilisierter Meerschweinchen kontrahiert sich ja gleichfalls nur (in der Schultz-Daleschen Versuchsanordnung), wenn er plötzlich und mit einer bestimmten Antigenkonzentration, welche ein gewisses Minimum nicht unterschreiten darf, in Kontakt gerät. Vor allem aber lehrt das Experiment am intakten Tier, daß ein und dieselbe intravenös gegebene Antigenmenge sehr verschieden wirkt, je nachdem sie schnell und auf einmal oder in stark verlangsamtem Tempo bzw. in kleinen Teilquoten („refracta dosi") injiziert wird; im ersten Falle kommt es zum akut letalen Schock, im zweiten bloß zu protrahierten Symptomen oder die klinischen Erscheinungen bleiben ganz aus und der Effekt der Antigenzufuhr besteht lediglich in einer raschen Desensibilisierung, kraft welcher die Meerschweinchen gegen die erneute Einbringung von Antigen in die Zirkulation partiell oder total refraktär werden (Friedberger und Mita, J. H. Lewis, Besredka u. a.).

Die Unfähigkeit subkutaner und intraperitonealer Injektionen den akuten Schock zu provozieren muß daher auf die quantitativen und zeitlichen Verhältnisse bezogen werden, unter welchen der Uebertritt des Antigens aus der Subkutis bzw. aus der Bauchhöhle in die Blutbahn erfolgt. Die Resorption vollzieht sich offenbar nicht nur sehr langsam —, dies konnte für subkutan eingespritztes Pferdeserum durch besondere Untersuchungen von J. H. Lewis, J. H. Smith, W. H. Park, Lémaire, Pfeiffer und Friedberger, Bullok, Morgenroth und Levy u. a. direkt nachgewiesen werden — sondern die ersten, ins Blut gelangenden Antigenquanten sind überdies so gering, daß sie die glatte Ringmuskulatur der Bronchien nicht genügend energisch zu reizen vermögen; sie desensibilisieren lediglich und paralysieren auf diese Weise die Wirkung der späteren Phasen der Antigenresorption.

Gegen diese Deutung läßt sich indes ein Einwand erheben: intrazerebrale Erfolgsinjektionen verhalten sich ähnlich wie intravenöse, die wirksamen Antigendosen gehören der gleichen Größenordnung an und es gelingt zweifellos, durch die intrazerebrale Probe einen akut tödlich verlaufenden Schock hervorzurufen. Treten nach einer intrazerebralen Antigeninjektion

nur protrahierte Symptome auf, so setzen sie doch schon nach 1—2 Minuten ein, endigen in weit höherem Prozentsatz mit Exitus als nach subkutaner oder intraperitonealer Antigenzufuhr und die erforderlichen Antigenmengen sind auch in diesem Falle wesentlich kleiner.

Wie soll man sich diese Beobachtungen zurechtlegen?

A. Besredka erblickte in ihnen den Beweis, daß der Sitz der anaphylaktischen Reaktion das Zentralnervensystem ist, und hat diese Ansicht in einer neueren Publikation („Théories de l'anaphylaxie" in „Traité de Physiologie normale et pathologique", T. 7, 1927, p. 434) aufrecht erhalten, wenngleich in etwas abgeschwächter Formulierung. Seit aber durch eine Reihe mannigfach variierter Experimente (an dekapitierten Tieren, an der isolierten überlebenden Meerschweinchenlunge usw.) gezeigt wurde, daß die typische Schockreaktion auch unter Umständen, welche eine Mitbeteiligung nervöser Zentren sicher ausschließen, prompt ausgelöst werden kann, gilt die Hypothese Besredkas allgemein als definitiv widerlegt.

Die Frage, warum die intrazerebrale Probe der subkutanen und intraperitonealen so weit überlegen ist und sich den Bedingungen der intravenösen Erfolgsinjektion in so hohem Grade annähert, fand dagegen keine Beachtung und ist unseres Wissens bisher unbeantwortet geblieben. Nur Doerr wies wiederholt darauf hin, daß hier eine Lücke besteht; sie soll durch die vorliegende Mitteilung wenigstens zum Teil ausgefüllt werden.

Im Sinne der Ausführungen über den Wirkungsmechanismus der subkutanen und intraperitonealen Antigeninjektion lag natürlich die Annahme nahe, daß intrazerebral eingespritztes Antigen vom Gehirn aus rascher und gleich im Beginn des Resorptionsprozesses in größeren Quantitäten ins Blut aufgenommen wird als vom Unterhautzellgewebe oder von der Bauchhöhle aus. Es war aber a priori unwahrscheinlich, daß die gesamte, in die Hirnsubstanz eingebrachte Antigenmenge in einem einzigen Schub oder doch in ganz kurzer Frist in die Zirkulation übertritt; man durfte vielmehr voraussetzen, daß lediglich eine gewisse, wenn auch ansehnliche Quote des intrazerebralen Injektionsgutes mit der erforderlichen Geschwindigkeit ins Blut gelangt. Im ersten Fall könnten intrazerebrale und intravenöse Erfolgsinjektionen dosologisch gleichwertig sein; im zweiten müßte eine Differenz, und zwar zuungunsten des intrazerebralen Prüfungsmodus zu konstatieren sein. In der Literatur stößt man in dieser Beziehung auf widersprechende Angaben.

Friedberger präparierte eine Serie von Meerschweinchen aktiv subkutan mit je 0,01 ccm Hammelserum und bestimmte nach Ablauf der Inkubationsperiode die akut tödliche Minimaldosis Hammelserum; sie betrug bei intravenöser Injektion 0,05, bei subduraler ebenfalls 0,05, bei intrazerebraler 0,04—0,06 ccm pro 100 g Meerschweinchengewicht, so daß Friedberger den Schluß zog, „daß die tödliche Dosis vom Gehirn aus sicher nicht nennenswert größer ist als von der Blutbahn". Besredka, der die intrazerebrale Methode in größerem Umfang angewendet hat als irgendein anderer Autor, anerkennt dagegen, daß sie an Wirksamkeit hinter der intravenösen zurücksteht. Die Größe des Unterschiedes hat er jedoch in seinen zusammenfassenden Darstellungen der Lehre von der Anaphylaxie sehr verschieden eingeschätzt. Das Verhältnis der intravenös und der intrazerebral tödlichen Minimaldosis Pferdeserum wird z. B. an einer Stelle mit 0,05—0,025 : 0,125—0,1 ccm, an einer anderen mit 0,1—0,05 : 0,125—0,07 ccm beziffert; die Differenz wäre somit auf Grund der ersten Angabe groß und experimentell bestimmbar, auf Grund der zweiten wäre sie verschwindend und würde in die natürlichen Fehlergrenzen des Auswertungsverfahrens fallen.

Unter diesen Umständen mußten wir uns durch eigene Versuche Gewißheit über den strittigen Punkt zu verschaffen suchen.

I. Vergleich der intravenösen mit der intrazerebralen Erfolgsinjektion.

27 Meerschweinchen von 180—220 g Körpergewicht wurden subkutan am gleichen Tage mit je 0,1 ccm eines und desselben Pferdeserums (Injektionsvolum = 1 ccm) aktiv präpariert. Nach 36 Tagen wurden sämtliche Tiere reinjiziert, zum Teil intravenös (linke Vena jugularis, Injektionsvolum = 1 ccm), zum Teil intrazerebral (Injektionsvolum = 0,1—0,2 ccm); zur Reinjektion verwendeten wir das gleiche Pferdeserum wie zur Sensibilisierung. Bei den intrazerebralen Injektionen wurde nicht, wie das sonst üblich ist, eine Knochenscheibe mit Hilfe eines Handtrepans aus dem Schädeldach entfernt, sondern bloß der Schädelknochen in der Scheitelgegend so weit mit einem geeigneten Instrument angebohrt, daß die Spitze der Injektionskanüle durch die punktförmige Perforationsöffnung gerade noch in das Gehirn eingeführt werden konnte. Man vermeidet auf diese Weise stärkere Blutungen aus der Diploë und den Meningen, die nach dem gewöhnlichen Trepanationsverfahren häufig auftreten, und es kommt auch nicht so leicht zu einem Wiederaustritt der Injektionsflüssigkeit aus dem Knochendefekt; ganz verhindern läßt sich der letztgenannte Uebelstand, der natürlich die exakte Bestimmung der intrazerebral tödlichen Minimaldosis erschwert, allerdings nicht, und da die dadurch bedingten Fehler (in Anbetracht des kleinen Injektionsvolums) groß sind, bleibt nichts anderes übrig als Versuche, in denen der Rückfluß des Injektionsgutes bemerkt wird, einfach auszuschalten.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt († 3 Min. = bedeutet Exitus in 3 Minuten nach der Erfolgsinjektion, s. S. schwere, und zwar bronchospastische Symptome, 0 keine Erscheinungen).

Injizierte Dosis Pferdeserum	Intravenös	Intrazerebral
0,2 ccm	—	† 4 Min.
0,2 „	—	† 4 „
0,2 „	—	s. S.
0,1 „	† 4 Min.	s. S.
0,1 „	—	θ
0,1 „	—	θ
0,1 „	—	θ
0,1 „	—	θ
0,1 „	—	θ
0,05 „	† 4 Min.	θ
0,05 „	† 4 „	θ
0,05 „	† 4 „	—
0,05 „	s. S.	—
0,05 „	† 4 Min.	—
0,05 „	s. S.	—
0,05 „	θ	—
0,05 „	s. S.	—
0,05 „	† 4 Min.	—
0,05 „	† 4 „	—
0,04 „	s. S.	—
0,02 „	s. S.	θ
0,01 „	s. S.	—

0,2 ccm Pferdeserum intrazerebral wirkten somit so wie 0,05 ccm intravenös, wenn der Exitus innerhalb weniger Minuten der vergleichenden Beurteilung zugrunde gelegt wurde; zwischen den Dosen, welche lediglich schwere bronchospastische Symptome (Hustenstöße, Dyspnoë und Erstickungskrämpfe) auszulösen vermochten, waren die Differenzen noch größer (0,1: 0,01 ccm). Unter voller Berücksichtigung der Fehlerquellen, mit denen die Auswertung der intrazerebralen Erfolgsdosis behaftet ist, ergab sich daher mit Sicherheit, daß die intravenöse Zufuhr des Antigens weit stärkere Effekte entfaltet, oder mit Rücksicht auf die Annahme, von der wir ausgingen (s. oben), daß nur eine Quote des intrazerebral injizierten Pferdeserums rasch genug in das Blut gelangt, um dort die für die Reizung der Bronchialmuskeln notwendige initiale Antigenkonzentration herzustellen. Daß diese Annahme zutrifft, ging übrigens auch aus dem Verhalten der Meerschweinchen hervor, welche auf die intrazerebrale Probe reagierten; es unterschied sich in keiner Beziehung von den Folgen einer intravenösen Reinjektion, weder symptomatologisch noch auch — sofern der Exitus eintrat — hinsichtlich des Obduktionsbefundes (flüssiges dunkles Blut, fortschlagendes Herz, maximal geblähte, starre und bläulich-weiß gefärbte Lungen). Auf diese Tatsache hat bereits Doerr aufmerk-

sam gemacht; sie beweist, daß das „Erfolgs- oder Schockorgan" beim intrazerebral reinjizierten Meerschweinchen nur die Lunge sein kann genau so wie bei der intravenösen Auslösung des akuten Schocks; das „Eintreffsorgan" des Antigens (das Gehirn) spielt keine Rolle, es beteiligt sich am Reaktionsgeschehen nicht oder nicht in maßgebender Weise.

Es bestehen also hier die nämlichen Verhältnisse, wie sie W. G. Schmidt und A. Stähelin für die Histaminvergiftung festzustellen vermochten. Die subdural bzw. intrazerebral tödliche Histamindosis ist für das Meerschweinchen ebenfalls und zwar wieder nur 2—3mal größer als die intravenös-letale, und der Tod erfolgt nach beiden Arten der Giftzufuhr durch Immobilisierung der Lunge im maximal geblähten Zustande. Daß das ins Gehirn eingespritzte Histamin de facto rasch in die Blutzirkulation gelangt, wurde von Schmidt und Stähelin allerdings nicht direkt nachgewiesen, läßt sich aber — wie die nachstehenden Versuche lehren — leicht zeigen.

II. Nachweis von Histamin im Blute nach intrazerebraler Injektion des Giftes.

5—15 mg Histaminchlorhydrat (in wässeriger, 5proz. Lösung) wurden normalen Meerschweinchen von 250 g Körpergewicht intrazerebral injiziert. Da die Dosen erheblich größer waren als die intrazerebral-tödliche Minimaldosis (nach W. G. Schmidt und Stähelin ca. 0,25 mg), verendeten sämtliche Tiere innerhalb von 3—5 Minuten im bronchospastischen Schock. Unmittelbar nach dem Tode wurde Blut aus dem Herzen mit steriler Rekordspritze aspiriert und sofort anderen normalen Meerschweinchen, bei denen die Jugularis schon vorher freigelegt worden war, intravenös eingespritzt. Die Resultate sind aus folgender Tabelle zu entnehmen:

Menge des dem Blutspender intrazerebral injizierten Histamins	Vom intrazerebral injizierten Spender auf den Empfänger übertragenes Blutquantum	Reaktion des Empfängers
5 mg	1,2 ccm	0
5 „	2,0 „	0
5 „	2,0 „	0
10 „	2,0 „	s. S. Erholung
10 „	2,0 „	s. S. „
10 „	2,0 „	s. S. „
10 „	2,0 „	† 2 Minuten
15 „	2,0 „	† 3 „

Daß die Reaktionen der mit Blut intravenös injizierten Meerschweinchen auf die sogenannte „Gerinnungstoxizität" des Blutes resp. auf intravasale Thrombosen zurückzuführen waren, konnte

durch die Sektion der beiden verendeten Tiere ausgeschlossen werden. Ueberdies zeigt die Tabelle deutlich, daß die Wirkung des Blutes nicht vom injizierten Blutvolum, sondern von der Histamindosis bestimmt wurde, welche dem Blutspender intrazerebral eingespritzt worden war, daß sie also auf den Histamingehalt des Blutes bezogen werden mußte. Es könnte befremden, daß sich das Blut nach intrazerebraler Injektion von 5 mg (des 50fachen Multiplums der intravenös-letalen Minimaldosis) als atoxisch erwies. Das ist indes lediglich der groben Methode des Histaminnachweises zuzuschreiben. Vom Gehirn aus wird nach den Versuchen von W. G. Schmidt und A. Stähelin etwa ⅓ des einverleibten Histamins resorbiert und diese Menge erfährt im Gesamtblut eine rund 40fache Verdünnung, so daß man in 2 ccm Blut selbst unter optimalen Verhältnissen (d. h. wenn das resorbierte Histamin weder an Organe gebunden noch ausgeschieden wird oder in die Lymphe übertritt) nicht mehr als $^5/_{60}$ mg Histamin = 0,08 mg erwarten darf, womit man schon die intravenös-letale Minimaldosis (0,1 mg für Meerschweinchen von 250—300 g) unterschreitet. Die Prüfung der Histamintoxizität des Blutes resp. des Blutserums am überlebenden Uterusmuskel oder die chemische Isolierung der Substanz aus dem Gesamtblut der zerebral injizierten Meerschweinchen hätten zweifellos noch positive Resultate ergeben, wo die Bestimmung des Histamingehaltes durch intravenöse Injektion naturgemäß versagen mußte. Die Anwendung besonders empfindlicher und zum Teil auch in quantitativer Hinsicht exakterer Verfahren der Histaminbestimmung schien uns jedoch überflüssig, da es sich in Anbetracht der Fragestellung nur darum handelte, den Uebergang großer, für die hämatogene Auslösung des Schocks ausreichender Histaminmengen aus dem Gehirn in die Blutzirkulation festzustellen; dieser Forderung genügten die oben angeführten Experimente.

Histamin ist aber ein relativ niedrig zusammengesetzter, in Wasser leicht löslicher und gut resorbierbarer Stoff. Seine Resorptionsfähigkeit erhellt aus der Tatsache, daß der bronchospastische Histaminschock beim Meerschweinchen auch durch subkutane oder intraperitoneale Injektion des Giftes ausgelöst werden kann (P. J. Hanzlik und H. T. Karsner, W. G. Schmidt und A. Stähelin u. a.). Allerdings setzen die Erscheinungen bei diesen Einverleibungsarten später ein als nach intravenösen und

intrazerebralen Einspritzungen, der Schock zeigt einen protrahierten Charakter und die letalen Dosen sind erheblich größer; immerhin bestehen aber Unterschiede gegenüber dem anaphylaktischen Bronchospasmus, der sich durch subkutane oder intraperitoneale Antigenzufuhr nicht hervorrufen läßt, Unterschiede, die wohl nur in der schweren Resorbierbarkeit der hochmolekularen, kolloidal gelösten Eiweißantigene begründet sein können.

Von diesen Ueberlegungen ausgehend, haben wir den Ueber-. gang verschiedener intrazerebral injizierter Stoffe in die Blutbahn untersucht und zu diesem Zwecke das Fluoreszein, das Tetanustoxin und normales Pferdeserum gewählt, Substanzen, welche sich im Blute leicht und schon in geringer Konzentration nachweisen lassen und die hinsichtlich ihrer Resorptionsfähigkeit (von der Subkutis aus!) drei Abstufungen, einen maximalen, einen mittleren und einen minimalen Grad, repräsentieren.

III. Fluoreszein.

Wie rasch Fluoreszein vom Unterhautzellgewebe aus ins Blut aufgenommen wird, ist bekannt und läßt sich in einfacher Weise demonstrieren. Legt man beim Kaninchen an der Spitze eines Ohrlöffels ein kleines subkutanes Fluoreszeindepot (0,2—0,3 ccm einer einprozentigen wässerigen Lösung) an und entnimmt man aus der Randvene des anderen Ohres in Zeitintervallen von 30 Sekunden Blutproben, so tritt die Grünfärbung im Serum des Aderlaßblutes schon eine Minute nach der Injektion auf. Der Fluoreszeingehalt der Aderlaßsera kann kolorimetrisch bestimmt werden, wenn man sich durch Vermischen von Kaninchenserum [1]) mit fallenden Fluoreszeinmengen eine Vergleichskala verschafft; er beträgt im Aderlaßserum etwa 0,0005—0,001 Proz. Von der Geschwindigkeit der Resorption kann man sich auch so überzeugen, daß man den Löffel, an dessen Spitze der Farbstoff subkutan injiziert wird, an der Basis amputiert; beträgt die Zeit zwischen der Subkutaninjektion und der Abtrennung des Ohres auch nur 30 Sekunden, so läßt sich die Grünfärbung des Blutplasmas nicht mehr verhindern und es dauert bloß etwas länger (3½ Minuten), bis die Konzentration des Fluoreszeins im

1) Das Kaninchenserum verdeckt durch seine Eigenfarbe etwas die Fluoreszeinfärbung; zur Herstellung der Testlösungen muß man daher Kaninchenserum und nicht Wasser verwenden.

Aderlaßserum 0,0005 Proz. erreicht. Nur wenn der Löffel unmittelbar nach der Injektion an seiner Wurzel abgeschnitten wird, bleibt das Blut fluoreszeinfrei.

Unter diesen Umständen erscheint es nicht besonders auffällig, daß auch intrazerebral eingespritztes Fluoreszein in kürzester Zeit im Blut auftritt. Derartige Versuche haben wir an Meerschweinchen von ca. 500 g Körpergewicht ausgeführt, denen wir 0, 3ccm einer einprozentigen Lösung in eine Hemisphäre injizierten. Die Blutproben wurden durch Herzpunktion so entnommen, daß zufällige Verunreinigungen derselben mit dem Farbstoff unmöglich waren, zur Gerinnung gebracht und der Fluoreszeingehalt der abgeschiedenen Sera kolorimetrisch (durch den Vergleich mit Testlösungen des Farbstoffes in Meerschweinchenserum) bestimmt. Bereits 1½ Minuten nach der intrazerebralen Injektion war das Serum des Herzblutes deutlich grün und enthielt etwa 0,0025 Proz. Farbstoff; die Fluoreszeinkonzentrationen waren also 2½—5mal so groß als bei den subkutan injizierten Kaninchen, was sich indes durch die geringere Blutmenge der Meerschweinchen völlig erklärt, so daß zwischen der Resorption von der Subkutis und vom Hirnparenchym aus weder in zeitlicher noch in quantitativer Hinsicht wesentliche Differenzen konstatiert werden konnten.

IV. Tetanustoxin.

Die chemische Konstitution des Tetanustoxins ist nicht bekannt. Es ist aber zweifellos höher molekular als Fluoreszein und sicher weit einfacher gebaut als die Proteine des Pferdeserums.

Letztere Aussage stützt sich unter anderem auf die Tatsache, daß aus Mischungen von Toxin und antitoxischem Pferdeserum das Toxin rascher in Gelatine diffundiert als das an Eiweiß gekettete Antitoxin. Die höhere Diffusibilität des Tetanustoxins im Vergleich zum Pferdeserum geht ferner daraus hervor, daß intravenös injiziertes Tetanustoxin schon nach 5—10 Minuten im Chylus des Ductus thoracicus nachweisbar wird, intravenös injiziertes Pferdeserum erst nach erheblich längerer Zeit, d. h. nach mehr als 3 Stunden (F. H. Teale und D. Embleton). Die eben genannten Autoren haben auch Untersuchungen darüber angestellt, innerhalb welcher Frist subkutan eingespritztes Tetanustoxin im Chylus des Ductus thoracicus und im Blute erscheint. Sie legten bei der Katze den Ductus frei, spritzten das Toxin ins Unterhautzellgewebe einer hinteren Extremität und fanden, daß der aus dem Ductus abtropfende Chylus 45 Minuten nach der Subkutaninjektion toxisch, d. h. fähig wird, bei weißen Mäusen tetanische Erscheinungen hervorzurufen; im Blute bzw. Blutserum subkutan injizierter Kaninchen vermochten Teale und Embleton

das Tetanustoxin erst nach 8 Stunden festzustellen, eine Differenz gegenüber den Chylusversuchen, die sich wohl dadurch erklärt, daß das mit dem Chylus in die Zirkulation gelangte Toxin durch das Blut der Versuchstiere (die Kaninchen wogen ca. 2 kg) ganz erheblich verdünnt wurde.

Um die Resorptionsverhältnisse des Tetanustoxins nach subkutaner und intrazerebraler Injektion exakt miteinander vergleichen zu können, injizierten wir Meerschweinchen von 400—450 g das Gift zum Teil in das Unterhautzellgewebe einer hinteren Extremität, zum Teil in eine Hirnhemisphäre. Das Injektionsvolum betrug in jedem Falle 0,2 ccm und die Toxindosen wurden so gewählt, daß der Nachweis im Blute nicht durch die in der Zirkulation erfolgende Verdünnung a priori unmöglich gemacht werden konnte. Nach verschiedenen Zeiten wurden Blutproben durch Herzpunktion entnommen und das frische, noch ungeronnene Blut wurde in der Menge von 0,5—0,6 ccm weißen Mäusen subkutan eingespritzt. Da zahlreiche derartige Experimente gleichsinnige Resultate gaben, seien nur einige Beispiele als Belege angeführt.

A. Subkutane Injektion des Toxins.

Meerschweinchen M 7 erhält 200 letale Mausdosen Tetanustoxin [1]) subkutan. Herzpunktionen nach 2, 5, 9 und 11 Minuten. Von jeder Blutprobe werden je 0,6 ccm je zwei weißen Mäusen subkutan in eine hintere Extremität injiziert. Sämtliche 8 Mäuse bleiben gesund und zeigen auch keine Anzeichen eines lokalen Tetanus.

B. Intrazerebrale Toxininjektion.

1. Meerschweinchen M_1 erhält die 20fach letale Mausdosis Tetanustoxin intrazerebral. Herzpunktionen nach 1½ und nach 15 Minuten.

Toxizität des Herzblutes nach 1½ Minuten:

Maus No. 1, 0,6 ccm Herzblut subkutan; lokaler Tetanus nach 4, Exitus nach 6 Tagen.

Maus No. 2, 0,6 ccm Herzblut subkutan; Tetanus nach 4, Exitus nach 8 Tagen.

Toxizität des Herzblutes nach 15 Minuten:

Maus No. 3, 0,6 ccm subkutan, Tetanus nach 5, Exitus nach 8 Tagen.

1) Benutzt wurde ein Tetanustrockentoxin der Behring-Werke (Marburg), für dessen Ueberlassung wir Prof. H. Schmidt zu Dank verpflichtet sind. Das Präparat wurde in 0,85 proz. NaCl-Lösung gelöst. Die Bestimmung der sicher letalen Dosis für die weiße Maus haben wir selbst vorgenommen, wobei sich herausstellte, daß $^1/_5$—$^1/_7$ der letalen Dosis nicht mehr ausreichte, um einen rein lokalen, nicht aszendierenden Tetanus zu erzeugen.

2. Meerschweinchen M_2 erhält 30 letale Mausdosen intrazerebral. Blutentnahmen nach 1, 3 und 9 Minuten. Von jeder Blutprobe werden je 0,5 ccm 2 weißen Mäusen (No. 5—No. 10) subkutan eingespritzt; alle 6 Mäuse zeigen nach 4—6 Tagen lokalen Tetanus, werden aber wieder gesund und überleben dauernd.

3. Meerschweinchen M_3 erhält 40 letale Mausdosen intrazerebral. Blutentnahmen nach 1, 2 und 15 Minuten. Von jeder Blutprobe werden je 0,6 ccm 2 weißen Mäusen (No. 11—No. 16) subkutan injiziert; bei allen 6 Mäusen entwickelt sich ein lokaler Tetanus der geimpften hinteren Extremität, doch geht keine Maus an allgemeinem Tetanus zugrunde.

4. Meerschweinchen M_4 erhält 200 letale Mausdosen intrazerebral; Herzpunktionen nach 3, 6 und 12 Minuten.

Toxizität des Herzblutes nach 3 Minuten:
Maus No. 1, 0,6 ccm Herzblut subkutan: lokaler Tetanus.

Toxizität des Herzblutes nach 6 Minuten:
Maus No. 2 und 3 reagieren mit lokalem Tetanus.

Toxizität des Herzblutes nach 12 Minuten:
Maus No. 4 und 5 reagieren zunächst mit lokalem, dann mit allgemeinem Tetanus und verenden in 5 Tagen.

Vom Gehirn aus erfolgte somit der Uebertritt des Tetanustoxins ganz wesentlich rascher als vom Unterhautzellgewebe aus, und zwar gesetzmäßig, d. h. bei allen intrazerebral injizierten Meerschweinchen. Es ergab sich also ein Unterschied gegenüber dem Fluoreszein, bei welchem der Uebergang des Farbstoffes ins Blut durch den Einverleibungsmodus nicht oder nicht in höherem Grade beeinflußt wurde. Das Histamin dürfte nach den Versuchen von W. G. Schmidt und Stähelin zwischen dem Fluoreszein und dem Tetanustoxin stehen.

V. Pferdeserum.

Die träge Resorption subkutan injizierten Pferdeserums ist auch für das Meerschweinchen (von J. H. Lewis) festgestellt worden, so daß wir auf eigene Versuche verzichten konnten. Dagegen mußte die Frage beantwortet werden, wann intrazerebral einverleibte Pferdeserumproteine im Blute nachzuweisen sind.

Zu diesem Zwecke wurde zunächst so vorgegangen, daß wir normalen Meerschweinchen von ca. 300 g Körpergewicht 0,2 ccm eines bestimmten Pferdeserums intrazerebral einspritzten; 5 Minuten später wurde Blut aus dem Herzen entnommen und 0,5 ccm jeder Blutprobe anderen normalen Meerschweinchen subkutan injiziert. Enthielt das Blut genügende Mengen Pferdeserum, so mußten die damit behandelten Meerschweinchen aktiv anaphylaktisch werden; ob das tatsächlich der Fall war, wurde nach Ablauf von 36 Tagen durch eine

intravenöse Erfolgsinjektion (0,4 ccm Pferdeserum) ermittelt. Zum Nachweis des Pferdeserums im Blute der zerebral injizierten Tiere diente somit seine sensibilisierende Wirkung; eine „Konkurrenz der Antigene" kam bei dieser Versuchsanordnung natürlich nicht in Betracht, da das Pferdeserum mit arteigenem, also nichtantigenem Blute vermengt war.

Die Resultate dieser Experimente zeigt folgende Tabelle:

No. der intrazebral injizierten Meerschweinchen	No. der Meerschweinchen, welche mit 0,5 ccm Blut der in der 1. Rubrik angeführten Tiere sensibilisiert wurden	Resultat der intravenösen Erfolgsinjektion bei den Tieren der 2. Rubrik
Ms. 50	Ms. 51	† 4 Minuten
„ 52	„ 53	θ
„ 54	„ 55	† 4 Minuten
„ 56	„ 57	θ

5 Minuten nach einer intrazerebralen Injektion war somit tatsächlich in 0,5 ccm Herzblut soviel Pferdeserum vorhanden, um ein normales Meerschweinchen maximal zu sensibilisieren, aber nicht immer, sondern nur etwa in der Hälfte der Versuche. Wie sind die Versager zu erklären? Unseres Erachtens durch die dosologischen Verhältnisse. Man kann einem Meerschweinchen nicht mehr als 0,2 ccm unverdünnten Pferdeserums intrazerebral injizieren; davon wird ca. $^1/_4$ rasch ins Blut aufgenommen und dort etwa auf das 40fache verdünnt; in 0,5 ccm Blut sind also bestenfalls 0,2 ccm: 320 = 0,0006 ccm Pferdeserum zu erwarten, d. h. Mengen, welche nicht mehr konstant sensibiliseren. Für das von uns verwendete Pferdeserum wurde das Sensibilisierungsvermögen, das ja nicht für alle Sorten Pferdeserum konstant zu sein braucht, direkt bestimmt, leider nur an wenigen Meerschweinchen und bloß in 4 Abstufungen.

4 Meerschweinchen erhielten fallende Mengen des zu prüfenden Pferdeserums subkutan in je 0,5 ccm Flüssigkeitsvolum; intravenöse Reinjektion nach 36 Tagen mit je 0,4 ccm Pferdeserum:

Präparierungsdosis	Resultat der Reinjektion
0,02 ccm	† 4 Minuten
0,002 „	† $3^1/_2$ „
0,0002 „	θ
0,00002 „	† 5 Minuten

Immerhin geht aus der Auswertung hervor, daß die Präparierung mit dem benützten Pferdeserum unter sonst gleichen Bedingungen, wie sie im Hauptversuch herrschten, unsicher wurde, sobald die Präparierungsdosis auf Zehntel Milligramme absank, wodurch die oben gegebene Begründung der Versager des Hauptversuches gestützt wird.

Artfremdes Eiweiß kann übrigens im Meerschweinchenblut resp. in dem aus solchem Blut abgeschiedenen Serum noch auf einem anderen Wege, nämlich durch die Immunpräzipitation nachgewiesen werden. Die gleichzeitige Anwesenheit von Meerschweinchenserum stört den Ausfall und die Beurteilung der Reaktion nicht, vorausgesetzt, daß das verwendete Präzipitin wirklich streng spezifisch auf das nachzuweisende Protein eingestellt ist. Im Institute war ein Antimenschenserum vom Kaninchen vorrätig, das diesen Anforderungen entsprach; 0,1 ccm desselben gab mit 10000fach verdünntem Menschenserum noch eine mäßig starke, mit 20000fach verdünntem Menschenserum eine schwache, aber deutliche Flockung, wobei es gleichgültig war, ob sämtliche Verdünnungen des Menschenserums wie üblich mit NaCl-Lösung hergestellt wurden oder ob man von einer Stammlösung von Menschenserum in Meerschweinchenserum ausging. Mit konzentriertem oder verdünntem Meerschweinchenserum allein gab das Präzipitin weder Niederschläge noch Trübungen.

Es wurden nun 3 Meerschweinchen mit je 0,2 ccm Menschenserum intrazerebral injiziert, nach 2, 8 und 16 Minuten Blutproben durch Herzpunktion entnommen, zur Gerinnung gebracht und die dekantierten Sera in fallenden Konzentrationen mit je 0,1 ccm Antimenschenpräzipitin versetzt. Sämtliche 9 Serumproben lieferten schwach, aber deutlich positive Reaktionen, 6 Sera (von 2 Meerschweinchen) noch in 20facher, 3 (vom dritten zerebral injizierten Tier) bloß in 10facher Verdünnung. Im Kubikzentimeter Serum der zerebral injizierten Meerschweinchen waren also schätzungsweise 0,0005—0,001 ccm Menschenserum, im Kubikzentimeter Vollblut ungefähr die Hälfte vorhanden, im Gesamtblut der lebenden Tiere (= 40 ccm) ca. 0,01—0,02 ccm, Mengen, welche zur Auslösung des Schocks ausgereicht hätten, falls die zerebral injizierten Meerschweinchen hochgradig sensibilisiert gewesen wären.

Vollzieht sich aber die Resorption zerebral injizierter Antigene beim sensibilisierten Meerschweinchen in derselben Weise wie beim normalen? Notwendig wäre dies nicht, da das Antigen durch den im Gehirn vorhandenen Antikörper partiell oder total abgesättigt werden könnte. Um zu einer Entscheidung zu kommen, wurden folgende Versuche ausgeführt.

5 Meerschweinchen (A 31—A 35) erhielten 0,1 ccm Pferdeserum subkutan zwecks aktiver Präparierung und wurden nach 5 Wochen mit je 0,2 ccm Pferdeserum intrazerebral reinjiziert; eines reagierte nicht, die 4 anderen verendeten

binnen 5 Minuten unter typischen Symptomen und mit charakteristischem Obduktionsbefund (Lungenblähung). Zum Teil unmittelbar nach dem Exitus, zum Teil noch während des Schocks wurden Blutproben durch Herzpunktion entnommen und je 2 ccm der Proben 5 anderen Meerschweinchen (B 31—B 35) subkutan injiziert; die B-Tiere wurden nach weiteren 5 Wochen durch intravenöse Injektion von 0,2 ccm Pferdeserum auf ihren anaphylaktischen Zustand geprüft.

Aktiv sensibilisierte A-Tiere			Mit dem Blute der A-Tiere behandelte B-Tiere	
Bezeichnung	Erfolg der zerebralen Probe	Intervall zwisch. zerebr. Injektion u. Blutentnahme	Bezeichnung	Erfolg der intravenösen Probe
A 31	† 4 Minuten	4 Minuten	B 31	† 4 Minuten
A 32	† 5 „	5 „	B 32	0
A 33	† 4 „	1 „	B 33	† 6 Minuten
A 34	0	17 „	B 34	s. S., überlebt
A 35	† 4 Minuten	1 „	B 35	0

A 34 und B 34 scheiden von der Betrachtung a limine aus, einmal, weil A 34 auf die intrazerebrale Probe nicht reagiert hatte, dann aber auch, weil die Blutentnahme bei A 34 erst nach 17 Minuten erfolgte, d. h. zu einer Zeit, welche an sich nicht geeignet ist, die für die Auslösung der Schocks erforderliche Geschwindigkeit der Antigenresorption zu beweisen. Es bleiben daher noch 4 Meerschweinchen (A 31, A 32, A 33 und A 35) übrig, bei denen die intrazerebrale Erfolgsinjektion den typischen, akut letalen Bronchospasmus hervorrief, die also zweifellos hochgradig anaphylaktisch waren. Bei diesen 4 A-Tieren konnte das zerebral gespritzte Pferdeserum zweimal im Blute nachgewiesen werden, und zwar schon 1—4 Minuten nach der zerebralen Injektion. Gegen diese Aussage läßt sich ein Einwand erheben. Im Blute sensibilisierter Meerschweinchen kann anaphylaktischer Antikörper vorhanden sein, und es wäre daher möglich, daß die B-Tiere nicht aktiv (durch Pferdeserum) sondern homolog passiv (durch Uebertragung des Antikörpers) präpariert waren. Ueberlegt man indes, daß sowohl bei den A- wie bei den B-Tieren zwischen Präparierung und Erfolgsinjektion lange (5wöchige) Intervalle eingeschaltet wurden, so wird eine homolog passive Sensibilisierung der B-Tiere unwahrscheinlich. Diese Kombination würde auch die Versager (B 23 und B 35) nicht erklären, die sich in dieser Versuchsanordnung geradeso häufig ereigneten wie in den analogen Experimenten an nichtsensibilisierten Meerschweinchen (s. oben). Man gelangt vielmehr zu dem Schluß, daß zerebral injiziertes Pferdeserum beim sensibilisierten wie beim nichtsensibilisierten Meerschweinchen in gleicher Weise in die Zirkulation übertritt und daß die Unmöglich-

keit, das Antigen im Blute konstant festzustellen, in beiden Fällen auf die Fehlergrenzen der Methodik zu beziehen sein dürfte.

Die zerebrale Injektion ist unvermeidlich mit einer Verletzung des Gehirns und seiner Häute verbunden; die Hirnsubstanz wird mechanisch geschädigt, es werden Lymphbahnen und Blutgefäße zerrissen und das Trauma variiert naturgemäß von Injektion zu Injektion erheblich, sowohl nach Art wie nach Umfang und hinsichtlich seiner Lokalisation, wenn man sich auch noch so sehr bemüht, die Injektionstechnik möglichst gleich zu gestalten. Aus dieser Tatsache könnte man folgern:

1. daß die rasche Resorption intrazerebral injizierter Stoffe überhaupt nur eine Konsequenz der Hirnverletzung ist und ausbleiben würde, wenn man die Substanzen ohne Gewebsschädigung in das Hirnparenchym bringen könnte;

2. daß die Verschiedenartigkeit des Hirntraumas dafür verantwortlich gemacht werden muß, wenn man zerebral injiziertes Pferdeserum das eine Mal im Blute nachzuweisen vermag, ein anderes Mal nicht.

Solche Vorstellungen würden jedenfalls mit unseren Kenntnissen über die Permeabilität der Blut-Liquorschranke besser harmonieren; auf ihre ausführliche Diskussion möchten wir an dieser Stelle verzichten, da das Thema den Gegenstand weiterer experimenteller Untersuchungen bilden soll und weil es uns hier in erster Linie darauf ankam, für die eigenartige Wirkung zerebraler Erfolgsinjektionen eine plausible Begründung zu finden. Es sei nur bemerkt, daß die ausschlaggebende Bedeutung des Hirntraumas gerade mit den Ergebnissen der Anaphylaxieforschung nicht in Einklang gebracht werden kann. Es ist allerdings im allgemeinen richtig, daß sensibilisierte Meerschweinchen auf die zerebrale Probe nicht so konstant mit akut letalem Schock reagieren wie auf die intravenöse; ist jedoch der anaphylaktische Zustand hochgradig, so erhält man auch mit dem zerebralen Prüfungsmodus in 90—100 Proz. der Versuche positive Resultate, ein Ergebnis, das sich nicht mehr auf die rein zufällige Beschaffenheit der Hirnverletzung zurückführen läßt. Vor allem aber geht aus den Arbeiten von Besredka und seinen Mitarbeitern, von Friedberger und anderen hervor, daß die intrazerebrale Erfolgsinjektion qualitativ und dosologisch gleichwertig ist mit der subduralen und intraspinalen; bei der subduralen Injektion ist das Trauma

des ZNS relativ gering, bei der intraspinalen fällt es — wenn sie unterhalb der Cauda equina ausgeführt wird — ganz weg. In demselben Sinne spricht die Erfahrung, daß Menschen, welche gegen Pferdeserum spezifisch empfindlich sind, auf intralumbale Injektionen verschiedener Heilsera besonders stark reagieren, und daß man bei diesem Einverleibungsmodus schon wiederholt schweren, ja tödlichen Schock beobachtet hat.

Zusammenfassung.

1. Um bei gleichartig sensibilisierten Meerschweinchen den akut tödlichen anaphylaktischen Schock auszulösen, benötigt man, wenn die Erfolgsinjektion intrazerebral ausgeführt wird, etwa viermal größere Dosen des Antigens (Pferdeserum) als für die intravenöse Probe.

2. Der akut letale Schock hat nach intrazerebraler wie nach intravenöser Antigeninjektion denselben Mechanismus; er beruht auf einer bronchospastischen Erstickung.

3. Die Auslösung des Schocks durch intrazerebrale Erfolgsinjektionen findet nicht im Gehirn statt, sondern vom Blut aus. Es ließ sich zeigen, daß zerebral eingespritztes Pferdeserum sowohl bei normalen wie bei sensibilisierten Meerschweichen rasch und in relativ großen Mengen in das zirkulierende Blut übertritt und daselbst mit Hilfe der Präzipitinreaktion oder durch das anaphylaktische Experiment (als sensibilisierendes Antigen) nachgewiesen werden kann).

4. Die Ueberlegenheit intrazerebraler über subkutane oder intraperitoneale Erfolgsinjektionen erklärt sich einfach dadurch, daß das Antigen von der Subkutis oder von der Bauchhöhle aus weit langsamer und zunächst nur in minimalen Quantitäten resorbiert wird bzw. in das strömende Blut gelangt.

Die in Punkt 4 präzisierte, vom Einverleibungsmodus abhängige Differenz der Resorptionsverhältnisse konnte auch für andere Stoffe (Histamin, Tetanustoxin) festgestellt werden.

Literatur.

Doerr, Handb. d. path. Mikroorganismen, 3. Aufl., Bd. 1, 1929.
Bethe, Handb. d. normalen und path. Physiologie, Bd. 13, 1929.
Besredka, Handb. d. Technik u. Methodik d. Immunitätsf., 1. Erg.-Bd., 1911.
Teale and Embleton, Journ. of the Royal Army Med. Corps, Vol. 35, 1920.
Schmidt, W. G., und Stähelin, diese Zeitschr., Bd. 60, 1929.
Doerr und Seidenberg, ebenda, Bd. 69, 1930, S. 169.

Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle) in Jena.